

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jolana Vavrová

Karbapenemázy a jejich molekulárně genetická detekce u bakterií způsobujících závažné
nozokomiální infekce

Carbapenemases and their molecular genetic detection in bacteria causing severe hospital
acquired infections

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Pavel Dřevínek, Ph.D.

Praha, 2012

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli MUDr. Pavlu Dřevínkovi, Ph.D. za věnovaný čas a cenné rady při zpracování bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10. 5. 2012

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na problematiku β -laktamáz hydrolyzujících karbapenemy. Vyskytují se v rámci molekulárních tříd A, B i D β -laktamáz a jsou identifikovány stále nové varianty. Produkce enzymů hydrolyzujících β -laktamová antibiotika je častý způsob mechanismu rezistence k těmto antibiotickým přípravkům u gramnegativních patogenů a je vlastní i vážným nozokomiálním patogenům jako například *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* a zástupci *Enterobacteriaceae*. Význam problematiky karbapenemáz v klinické praxi podtrhuje skutečnost, že karbapenemy patří mezi širokospektrá β -laktamová antibiotika, která jsou zařazována do kategorie rezervních antibiotik. Nárůst případů rezistence na karbapenemy je způsoben zejména šířením genů karbapenemáz. Detekce karbapenemáz a sledování jejich výskytu je nutné nejen pro nastavení optimální antibiotické léčby, ale také pro kontrolu šíření bakteriálních kmenů produkujících karbapenemázy.

Klíčová slova: β -laktamázy, karbapenemázy, nozokomiální infekce, β -laktamy, karbapenemy, molekulárně genetická detekce

Abstract

The aim of this study is to characterize β -lactamases that hydrolyze carbapenems. They belong to molecular classes A, B and D and their new variations are still being identified. The production of enzymes hydrolyzing β -lactam antibiotics is common among Gram-negative bacteria which include also serious nosocomial pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* or members of *Enterobacteriaceae* family. The importance of the carbapenemases in clinical practice underlines the fact that carbapenems are broad-spectrum antibiotics, which are considered the reserve antibiotics. An increase in the number of cases of the carbapenem resistance is caused mainly by spread of genes encoding carbapenemases. Detection of carbapenemases and surveillance of their occurrence are both essential not only for optimal management of patients' care, but also for control of the spread of bacterial strains producing carbapenemases.

Key words: β -lactamases, carbapenemases, hospital-acquired infections, β -lactams, carbapenems, molecular-genetic detection

Obsah

Seznam užitých zkratk	3
1. Úvod	5
2. β -laktamová antibiotika	5
2.1. Karbapenemy	6
2.2. Mechanismus účinku β -laktamů	7
2.3. Rezistence bakterií k β -laktamům	8
3. β -laktamázy	8
3.1. Klasifikace β -laktamáz	10
3.2. Karbapenemázy	11
3.2.1. Karbapenemázy molekulární třídy A	12
3.2.1.1. GES/IBC	12
3.2.1.2. KPC	13
3.2.1.3. SME	13
3.2.1.4. IMI/NMC-A	14
3.2.2. Karbapenemázy molekulární třídy B	14
3.2.2.1. IMP	15
3.2.2.2. VIM	16
3.2.2.3. NDM	16
3.2.2.4. MBL s omezeným geografickým výskytem	16
3.2.3. Karbapenemázy molekulární třídy D	17
3.2.4. Karbapenemázy v České republice	18
4. Karbapenemázy u nozokomiálních patogenů	18
4.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	19
4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
4.3. <i>Enterobacteriaceae</i>	20
4.3.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21

5. Detekce karbapenemáz	21
5.1. Fenotypové testy.....	22
5.2. Molekulární testy	23
6. Zahájení pilotní studie detekce karbapenemáz Fakultní nemocnice v Motole	24
6.1. Detekce vybraných karbapenemáz pomocí PCR.....	25
7. Závěr	27
8. Přehled užití literatury.....	28

Seznam užitých zkratek

7-ACA	7-Aminocephalosporinic acid	Kyselina 7-aminocefalosporinová
6-APA	6-Aminopenicillanic acid	Kyselina 6-aminopenicilanová
A	Adenine	Adenin
Asn	Asparagine	Asparagin
Asp	Aspartic acid	Kyselina asparagová
<i>bla</i>	β -lactamase gene	Gen β -laktamázy
C	Cytosine	Cytosin
CA	Clavulanic acid	Kyselina klavulanová
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
DIM	Dutch imipenemase	Nizozemská imipenemáza
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Etylendiamintetraoctová kyselina
ESBL	Extended spectrum β -lactamases	β -laktamázy s rozšířeným spektrem
ESBL _{CARBA}	ESBL with hydrolytic activity against carbapenems	ESBL s hydrolytickou aktivitou proti karbapenemům
EtBr	Ethidium bromide	Ethidium bromid
FN		Fakultní nemocnice
G	Guanine	Guanin
GES	Guiana extended spectrum β -lactamase	Guianská β -laktamáza s rozšířeným spektrem
GIM	German imipenemase	Německá imipenemáza
Gly	Glycine	Glycin
His	Histidine	Histidin
IBC	Integron-borne cephalosporinase	Cefalosporináza kódována na integronu
IMI	Imipenem-hydrolyzing β -lactamase	β -laktamáza hydrolyzující imipenem
IMP	Imipenem-hydrolyzing β -lactamase	β -laktamáza hydrolyzující imipenem
Lys	Lysine	Lysin
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase	<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemáza
KHM	Kyorin Health Science metallo- β -lactamase	Metallo- β -laktamáza Kyorin Health Science

MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight	
MBL	Metallo- β -lactamase	Metalo- β -laktamáza
MIC	Minimum inhibitory concentration	Minimální inhibiční koncentrace
MHT	Modified Hodge test	Modifikovaný Hodgeův test
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NDM	New Delhi metallo- β -lactamase	Metalo- β -laktamáza Nového Dillí
NMC	Not-metalloenzyme carbapenemase	Karbapenemáza bez kovové složky
OXA	Oxacillin hydrolyzing β -lactamase	Oxacilin hydrolyzující β -laktamáza
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PBP	Penicillin binding protein	Penicilin vázající proteiny
S	Cytidine or Guanine	Cytidin nebo guanin
Ser	Serine	Serin
SIM	Seoul imipenemase	Imipenemáza ze Soulu
SME	<i>Serratia marcescens</i> enzyme	Enzym <i>Serratia marcescens</i>
SPM	Sao Paulo metallo- β -lactamase	Sao Paolo Metalo- β -laktamáza
T	Thymine	Thymin
Thr	Threonine	Threonin
VIM	Verona integrone-encoded metallo- β -lactamase	Veronská metalo- β -laktamáza kódovaná na integronu
X	Any aminoacid	Libovolná aminokyselina
Y	Cytidine or thymine	Cytidin nebo thymin

1. Úvod

Karbapenemázy jsou enzymy bakteriálního původu se schopností hydrolyzovat karbapenemy a další β -laktamová antibiotika. Tyto enzymy spadají do velké skupiny enzymů nazývaných β -laktamázy, pojmenovaných podle jejich schopnosti hydrolyzy β -laktamového kruhu. β -laktamázy se dělí do 4 molekulárních tříd a ve třech z nich se objevují i různé typy karbapenem-hydrolyzujících enzymů. Vyskytují se u grampozitivních i gramnegativních, patogenních i nepatogenních bakteriálních druhů. Pozornost vzbuzuje šíření genů mezi patogeny, zejména těmi gramnegativními. Produkce karbapenemáz se týká i významných nozokomiálních patogenů jako *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *K. pneumoniae* a dalších zástupců *Enterobacteriaceae*. Nozokomiální infekce komplikují zdravotnickou péči a rozšíření spektra rezistence k antibiotikům mezi jejich původci může vyústit i ve zvýšené procento úmrtnosti mezi pacienty vyžadujícími nemocniční péči. Detekce karbapenemáz je často obtížná, a tak potvrzení jejich přítomnosti spočívá v kombinaci fenotypových a molekulárně genetických testů.

Cílem této práce je upozornit na nebezpečí množících se případů rezistence na karbapenemová antibiotika, za které jsou v mnoha případech zodpovědny právě karbapenemázy. Výskyt karbapenemáz u nozokomiálních patogenů je závažným terapeutickým problémem, který by neměl být přehlížen. Detekcí a sledováním jejich výskytu fenotypovými a genotypovými metodami, se může alespoň z části předejít jejich šíření v nemocničním prostředí i v komunitě.

2. β -laktamová antibiotika

Éra antibiotik začala v první polovině 20. století objevem sulfonamidů a penicilinu. Penicilin byl objeven již v roce 1928 Alexandrem Flemingem (*Fleming, 1929*). Odhalení β -laktamového kruhu - 6-aminopenicilanové kyseliny (6-APA), jako klíčového prvku v syntéze penicilinu, otevřelo možnosti vytváření nových, modifikovaných penicilinů jako například meticilinu a karbenicilinu (*Acred et al., 1967; Fairbrother and Taylor, 1961; Sheehan and Henery-Logan, 1959*). Kromě synteticky modifikovaných variant se objevovaly další přirozené zdroje β -laktamů. Cefalosporin C izolovaný z *Cephalosporium acremonium* dal vzniknout nové skupině β -laktamů, protože místo 6-APA obsahoval kyselinu 7-aminocefalosporinovou (7-ACA), která pak byla použita jako prekurzor pro další generace cefalosporinových antibiotik (*Abraham and Newton, 1961*). Dále byly u bakteriálních druhů

izolovány penemy, karbapenemy a monobaktamy, s β -laktamovým jádrem odlišným od 6-APA i 7-ACA (Imada et al., 1981; Kahan et al., 1983; Sykes et al., 1981).

β -laktamová antibiotika jsou nejčastější užívaná antibiotika v praxi. Jsou využívána k léčbě mnoha systémových i orgánových bakteriálních infekcí a jsou podávána samostatně nebo v kombinaci s jinými antibiotiky. Obvyklé rozdělení β -laktamů je podle chemické struktury, a to na peniciliny, cefalosporiny, cefamyciny (ty jsou někdy zařazovány do 2. generace cefalosporinů), karbapenemy a monobaktamy (viz tab. 1). Účinnost β -laktamových antibiotik mohou navyšovat inhibitory β -laktamáz, mezi něž se řadí v praxi využívaný sulbaktam, tazobaktam a kyselina klavulanová (Gallagher and MacDougall, 2011).

Tab. 1 Dělení β -laktamových antibiotik. Upraveno dle Gallagher and MacDougall (2011)

β-laktamová antibiotika		
Peniciliny	Základní	benzylpenicilin (penicilin G), fenoxymetylpenicilin (penicilin V)
	antistafylokokové	oxacilin, nafcilin, meticilin, cloxacilin, dicloxacilin
	Širokospektré	aminopeniciliny: amoxicilin, ampicilin karboxypeniciliny: carbenicilin, ticarcilin ureidopeniciliny: piperacilin, azlocilin
Cefalosporiny	1. generace	cefalotin, cefazolin, cefradin, cefadroxil, cefaclor
	2. generace	cefuroxim, cefonicid, cefrozil, cefamandol
	3. generace	cefotaxim, ceftriaxon, cefoperazon, cefixim
	4. generace	cefpirom, cefepim
	5. generace	ceftaroline, ceftobiprole
Cefamyciny		cefoxitin, cefotetan
Karbapenemy		imipenem/cilastatin, meropenem, ertapenem, doripenem
Monobaktamy		aztreonam
Inhibitory β -laktamáz		kys. klavulanová (+ amoxicilin, + ticarcilin) sulbaktam (+ ampicilin, + cefoperazon) tazobaktam (+ piperacilin)

2.1. Karbapenemy

Karbapenemy používané v humánní medicíně jsou synteticky připravená β -laktamová antibiotika. Změna v jejich struktuře jim poskytla významnou odolnost vůči většině forem β -laktamáz. Karbapenemy tvoří skupinu β -laktamových antibiotik s širokospektrým účinkem a velkým terapeutickým potenciálem. Z důvodu snahy zachovat jejich vysokou účinnost pro klinicky zvláště závažné stav se řadí mezi rezervní antibiotika (Edwards and Betts, 2000).

Thienamycin izolovaný ze *Streptomyces cattleya* byl prvním karbapenemovým antibiotikem. Thienamycin samotný nemohl být využit pro další vývoj kvůli své chemické nestabilitě. Nasyntetizovaný amidinový derivát thienamycinu imipenem vykazoval oproti thienamycinu vyšší stabilitu a zároveň lepší antimikrobiální vlastnosti. Imipenem je metabolizován v ledvinách na toxický produkt, proto je vždy podáván souběžně s cilastatinem, který blokuje renální dehydropeptidázu katalyzující tuto reakci (Kahan *et al.*, 1983). Do karbapenemů patří kromě imipenemu i meropenem, ertapenem a doripenem (Gallagher and MacDougall, 2011).

Meropenem, je proti dehydropeptidáze I stabilní, a proto se nepodává s cilastatinem (Edwards *et al.*, 1989). Je aktivní jak proti mnoha grampozitivním, tak i gramnegativním a anaerobním bakteriím. Spektrum účinku meropenemu a imipenemu se příliš neliší. Meropenem je o něco lepší volbou při léčbě infekcí způsobených zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, ale proti grampozitivním bakteriím je méně aktivní než imipenem (Sentochnik *et al.*, 1989).

Ertapenem vykazuje ve srovnání s imipenemem a meropenem slabší aktivitu. Není účinný proti *Pseudomonas* spp. ani *Acinetobacter* spp., a není tak vhodný pro léčbu většiny nozokomiálních infekcí (Wexler *et al.*, 2000).

Aktivita doripenemu proti gramnegativním patogenům je *in vitro* srovnatelná s aktivitou meropenemu a proti grampozitivním organismům zase s aktivitou imipenemu (Ge *et al.*, 2004).

2.2. Mechanismus účinku β -laktamů

Cílem β -laktamových antibiotik jsou penicilin vázající proteiny (PBP), které se účastní posledního kroku syntézy peptidoglykanu, tedy základní složky buněčné stěny bakterií. Přírodním substrátem PBP je stěnový polymer končící dipeptidem D-Alanyl-D-alanin. Purifikované enzymy vykazují aktivitu D-alanin karboxypeptidázovou, peptidoglykan transpeptidázovou a peptidoglykan endopeptidázovou. Při kovalentním navázání β -laktamu do aktivního místa PBP, dojde k narušení amidové vazby β -laktamu a jeho kovalentní vazbě k serinovému zbytku v aktivním místě PBP, což vede k inaktivaci PBP. Poškození syntézy buněčné stěny vede ke strukturní i osmotické nestabilitě a posléze ke smrti rostoucího mikroorganismu (Cooper *et al.*, 1949; Spratt, 1977).

2.3. Rezistence bakterií k β -laktamům

Rezistence na antibiotika, tedy schopnost mikroorganismu přežít inhibiční koncentrace příslušného antibiotika v jeho bezprostředním okolí, může být přirozenou vlastností bakteriálních druhů, které se tak nacházejí mimo spektrum účinku daného antibiotika (například díky nepřítomnosti cílové struktury). Výsledkem horizontálního přenosu genů nebo jedné či více mutačních událostí může vzniknout sekundární získaná rezistence. Mezi hlavní sekundární mechanismy rezistence na antibiotika patří snížená akumulace antibiotika v buňce, enzymy modifikující či degradující antibiotika a změna cílové struktury či metabolické cesty (Hooper, 2000; Li and Nikaido, 2004; Shaw et al., 1993). Pokud koexistuje více těchto mechanismů u jednoho organismu, tak to často může vést k multirezistentnímu fenotypu (Nikaido, 2009). Definice multirezistentního kmene je nejčastěji definována jako rezistence na karbapenemy nebo rezistence na 3 a více různých antibiotických skupin (Díez et al., 2004).

Základní podmínkou účinnosti β -laktamů je 1. neporušenost β -laktamového kruhu, 2. schopnost proniknout buněčnou stěnou bakterie a 3. přítomnost citlivých PBP. Rezistence bakterií na β -laktamová antibiotika vznikne porušením jedné z těchto podmínek. V 1. případě se většinou jedná o produkci β -laktamázy, enzymů štěpících amidovou vazbu v β -laktamovém kruhu antibiotika a je to klinicky nejvýznamnější mechanismus rezistence na β -laktamy. Schopnost průniku buněčnou stěnou může být snížena pozměněním porinů vnější membrány. Antibiotikum může být také po průniku do buňky odstraňováno ven činností efluxových pump, využívajících β -laktamy jako substrát. Třetí podmínka, přítomnost citlivých PBP, může být porušena důsledkem pozměněného či získaného PBP s nízkou afinitou k β -laktamům. (Pfeifer et al., 2010). Známým příkladem organismu rezistentního na β -laktamová antibiotika je meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Benner et al., 1968). První izoláty vykazující rezistenci na meticilin u rodu *Staphylococcus*, byly popsány již dva roky po jeho uvedení do klinické praxe (Barber, 1961). Tato rezistence je díky genu *mecA*, jehož produktem je pozměněný PBP s nižší afinitou k meticilinu a ostatním β -laktamům (Hartman and Thomasz, 1984). V kombinaci s dalšími mechanismy rezistence proti dalším skupinám antibiotik je multirezistentní *Staphylococcus aureus* celosvětovým problémem (Klevens et al., 2006).

3. β -laktamázy

β -laktamázy jsou enzymy zcela bakteriálního původu. Umožňují degradaci β -laktamových antibiotik a chrání tak bakteriální buňku před jejich toxickými účinky (obr. 1). β -laktamázy

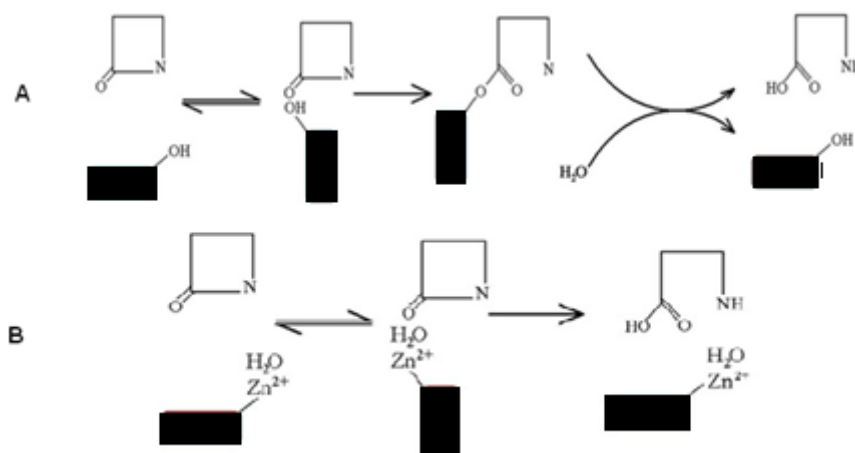
jsou nejčastější příčinou rezistence na β -laktamová antibiotika u gramnegativních bakterií. Jedinou bodovou mutací mohou změnit svou substrátovou specifitu (Davies, 1994).

Enzym se schopností katalyzovat hydrolýzu β -laktamového kruhu byl popsán již v roce 1940 Abrahamem a Chainem, tedy ještě před samotným uvedením β -laktamových antibiotik do klinické praxe (Abraham and Chain, 1988). V padesátých letech se ještě nepředpokládalo, že je horizontální přenos genů tak “snadný” a tak málo druhově specifický. Vědci zabývající se bakteriální genetikou se shodovali, že pravděpodobnost získané rezistence na antibiotika během léčby je malá, protože i frekvence mutací k tomu směřující je nízká. Dnes je zřejmé, že k horizontálnímu přenosu genů rezistence na různá antibiotika včetně β -laktamových dochází a že akvizice genů rezistence představuje podstatný problém v léčbě infekcí. Dnes jsou tyto enzymy považovány za primární příčinu rezistence na β -laktamová antibiotika (Davies, 1994). β -laktamázy sdílí několik vysoce konzervovaných aminokyselinových sekvencí s PBP a tvoří s nimi rodinu penicilin rozpoznávajících enzymů. Jsou produkovány grampozitivními i gramnegativními bakteriemi (Medeiros, 1997).

V klinické praxi lze k léčbě infekce, kterou způsobují bakterie produkující β -laktamázy, použít β -laktamové antibiotikum jen tehdy, pokud na něj daná β -laktamáza nepůsobí, nebo je podáno v kombinaci s inhibítor β -laktamázy (např. kyselina klavulanová, sulbaktam) (Reading and Cole, 1976; Retsema et al., 1980). Alarmující je skutečnost, že existují β -laktamázy degradující prakticky všechna β -laktamová antibiotika a jsou zároveň rezistentní vůči inhibitorům β -laktamáz (Drawz and Bonomo, 2000).

Mezi nejčastěji používané inhibitory serinových β -laktamáz patří sulbaktam, kyselina klavulanová a tazobaktam (Kuck et al., 1989). Klavulanát byl první inhibitor β -laktamáz, který byl uveden do klinické praxe. Je to velmi slabé β -laktamové antibiotikum, které se samostatně pro malou účinnost nepoužívá. V kombinaci s jiným β -laktamovým antibiotikem (např. amoxicilin) však snižuje jeho MIC. Váže se v aktivním místě β -laktamáz na serinové zbytky a tím je inhibuje (Reading and Cole, 1976). Všechny tři zmíněné inhibitory β -laktamáz jsou strukturně podobné penicilinu a největší účinnost mají proti molekulární skupině A β -laktamáz (viz kapitola 3.1.) (Drawz and Bonomo, 2000). Strukturně odlišné metalo- β -laktamázy z molekulární skupiny B jsou na většinu inhibitorů serinových β -laktamáz rezistentní. Jako inhibitory této skupiny β -laktamáz se využívají sloučeniny, které fungují jako chelátory kovových iontů nutných pro hydrolytickou aktivitu metalo- β -enzymů. Jsou to například deriváty thiolových esterů kyseliny thioglykolové a často používaná kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA) (Aoki et al., 2010; Payne et al., 1997).

Obr. 1 Schéma hydrolýzy β -laktamového kruhu antibiotika (A): serinovou β -laktamázou, (B): metalo- β -laktamázou. Černě vybarvená je β -laktamáza. Donorem molekuly vody pro vlastní hydrolýzu je v prvním případě serin, ve druhém dvojmocný kationt zinku. Převzato z www.betalaktamazy.cz s laskavým svolením autora stránek Ing. Jaroslava Hrabáka, Ph.D.



3.1. Klasifikace β -laktamáz

Rozdělení β -laktamáz, které odráží funkční i sekvenční heterogenitu těchto enzymů je poměrně komplikované. Nejvíce používaná klasifikace β -laktamáz je Amblerova klasifikace, která je založená na aminokyselinových sekvencích. Ambler původně specifikoval jen dvě třídy. Skupinu A se serinem v aktivním místě a skupinu B vyžadující pro aktivitu kovové ionty (Ambler, 1980). Nyní zahrnuje Amblerova klasifikace 4 molekulární skupiny. Skupiny A, C a D používají pro inaktivaci β -laktamových antibiotik katalyticky aktivní serinový zbytek (obr. 1A). Molekulární skupina B zahrnuje metaloenzymy vyžadující pro svou katalytickou aktivitu zinek a mají proto odlišný mechanismus fungování (obr. 1B). Serinovým β -laktamázám se skupina B nepodobá ani na strukturní úrovni (Hall and Barlow, 2005; Prosperi-Meys et al., 2001).

Další možné dělení je podle Bushe (Bush, 1989). Bushova klasifikace je vytvořená na základě funkční charakteristiky jednotlivých enzymů a koreluje s molekulární strukturou enzymů. Rozdělení do 3 tříd je současná podoba funkční klasifikace. Třída 1 zahrnuje cefalosporinázy patřící do molekulární třídy C. Třída 2 je rozdělena do mnoha podskupin a je tvořena enzymy molekulární třídy A i D. Třetí třída je jedinečná po strukturní i funkční stránce a odpovídá molekulární třídě B (Bush and Jacoby, 2010).

Nomenklatura β -laktamáz není příliš sjednocená. Enzymy jsou pojmenovávány po preferovaném substrátu, biochemických vlastnostech, názvech genů, bakteriích, pacientech,

ale také po místech nálezů či nálezcích. Deriváty enzymů vzniklých třeba jen jednou aminokyselinovou substitucí jsou pak odlišeny číslem (*Bush and Jacoby, 1997*).

V tabulce 2 je dělení β -laktamáz podle Bushe a Amblera se základními charakteristikami skupin. Za klinicky nejproblematictější jsou považovány zvláště β -laktamázy typu ESBL, AmpC a karbapenamázy (*Livermore and Woodford, 2006*). ESBL enzymy jsou rychle se rozvíjející skupinou β -laktamáz patřící hlavně do molekulární skupiny A, ale také D (*Bush et al., 1995*). Nejčastěji vznikají mutacemi v genech TEM-1, TEM-2 a SHV-1 a často jsou kódovány na plazmidech. Mutace rozšiřují jejich spektrum hydrolýzy a z β -laktamů jsou citlivé jen na cefamyciny a karbapenemy. Jsou inhibovány kyselinou klavulanovou (*Cao et al., 2002; Paterson and Bonomo, 2005*). AmpC β -laktamázy tvoří molekulární skupinu C a mají spektrum hydrolýzy obdobné jako ESBL, ale nejsou inhibované kyselinou klavulanovou (*Bush et al., 1995*). Kmeny produkující ESBL sice nejsou primárně rezistentní ke karbapenemům, ale v kombinaci s nízkou expresí porinových proteinů se tato rezistence může objevit (*Jacoby, 2009*).

Tab. 2 Klasifikace β -laktamáz, zvýrazněny podskupiny zahrnující karbapenamázy. Převzato z www.betalaktamazy.cz s laskavým svolením autora stránek Ing. Jaroslava Hrabáka, Ph.D.

Dle Bush-Jacoby-Medeiros		Podskup.	Amblerův systém	Hlavní charakteristiky
1	Cefalosporinázy		C cefalosporinázy	chromozom., rezistentní ke všem β -laktamům, kromě karbapenemů, neinhibované CA
2	Penicilinázy	2a	A serinové β -laktamázy	stafylokokové penicilinázy
		2b		rozšířené spektrum TEM-1,2, SHV-1
		2be		šírokospektré TEM-3, SHV-2
		2br		inhibiotr-rezistentní
		2c		hydrolyzující karbenicilin
		2e		cefalosporinázy inhibované CA
		2f		karbapenamázy inhibované CA
		2d	D hydrolyz. oxacilin	hydrolýza kloxacillinu (OXA)
3	metalo- β -laktamázy	3a	B metaloenzymy	Enzymy závislé na iontu kovu (obvykle Zn^{2+})
		3b, 3c		
4			Nezařazeno	různé enzymy

pozn.: CA je zkratka pro kyselinu klavulanovou.

3.2. Karbapenamázy

Karbapenemy jsou významnou skupinou antibiotik, která si zachovává aktivitu proti AmpC i ESBL. Jejich užívání je však ohroženo zvětšujícím se množstvím výskytu

karbapenemáz. Karbapenemázy jsou β -laktamázy, které kromě jiného jsou schopny hydrolyzovat i karbapenemy. Přesná definice termínu karbapenemáza však neexistuje. Giske a spolupracovníci navrhuji pro popis karbapenemáz termín „extended-spectrum β -lactamases with hydrolytic activity against carbapenems“ (ESBL_{CARBA}), tedy širokospektré β -laktamázy hydrolyzující karbapenemy (Giske *et al.*, 2009). Tyto enzymy vykazují často jen relativně nízkou kapacitu hydrolyzy karbapenemů, a proto někteří autoři navrhuji zahrnutí enzymů vykazujících imipenemázovou aktivitu ($k_{\text{cat}}/V_{\text{max}} > 1 \text{ } (\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$). Ne všechny karbapenemázy zprostředkovávají rezistenci na karbapenemy a úroveň rezistence je závislá na hostitelském organismu (Walsh, 2010).

O existenci karbapenemáz se vědělo již v osmdesátých letech minulého století, v době uvedení imipenemu na trh. U klinicky důležitých bakterií byly objeveny až v letech devadesátých v Japonsku (Minami *et al.*, 1996).

Karbapenemázy často rozpoznávají většinu hydrolyzovatelných β -laktamů a některé poskytují i rezistenci na aminoglykosidy a fluorochinolony. Tvoří velmi heterogenní skupinu, která má zástupce v molekulárních třídách A, B i D (Livermore, 2002).

3.2.1. Karbapenemázy molekulární třídy A

Molekulární třída A je funkčně velice heterogenní a zahrnuje tak v sobě i některé karbapenemázy. Hodnoty MIC se u nich pohybují v širokém spektru od mírně zvýšených po plně rezistentní. V rámci funkčního dělení patří do podskupiny 2f (tab. 2) (Bush *et al.*, 1995). Všechny enzymy patřící do molekulární třídy A, karbapenemázy nevyjímaje, obsahují konzervované motivy v aktivním místě – Ser-X-X-Lys, Ser-Asp-Asn a Lys-Thr-Gly. Typy karbapenemáz označované jako SME, NMC a IMI (viz kapitoly 3.2.1.1., 3.2.1.3., 3.2.1.4), pak ještě mají konzervované cysteinové zbytky v pozicích 69 a 239, tvořící disulfidický můstek. Na rozdíl od molekulární třídy B vykazují tyto karbapenemázy i aktivitu proti aztreonamu. Fylogenetickými analýzami došlo k rozdělení karbapenemáz této molekulární třídy do 4 klastřů sdílejících 35 - 70 % aminokyselinové sekvenční identity. Jsou to skupiny GES, KPC, SME, IMI/NMC-A (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2007; Queenan and Bush, 2007). Nejvíce rozšířenými z této třídy jsou enzymy GES a KPC, které jsou spojeny s plazmidy. KPC enzym pak je považován za nejvíce klinicky významný z této skupiny z důvodu největšího rozšíření (viz 3.2.1.2.) (Landman *et al.*, 2007).

3.2.1.1. GES/IBC

GES-1 a IBC-1 se liší pouze ve dvou aminokyselinových substitucích. Nomenklatura GES/IBC rodiny byla několikrát revidována a nakonec byla IBC jména předělána na

nomenklaturu GES (Jacoby, 2006). S ostatními karbapenemázami skupiny A jsou si příbuzné poměrně málo. S KPC-2 je 36% identita aminokyselinové sekvence. GES-1 byla identifikována poprvé u izolátu *Klebsiella pneumoniae* z Francouzské Guyany a IBC-1 (později označována jako GES-7) v Řecku u izolátu *Enterobacter cloacae*. Oba nálezy byly zaznamenány v roce 2000 (Giakkoupi et al., 2000; Poirel et al., 2000a; Jacoby, 2006).

Enzymy GES rodiny jsou lokalizovány na plazmidech v rámci integronů třídy 1 a mají široké spektrum hydrolýzy (Poirel et al., 2000a). V roce 2001 se rozšířilo jejich hydrolyzační spektrum o imipenem díky nálezu GES-2 u klinického izolátu *Pseudomonas aeruginosa* (Poirel et al., 2001).

Minimálně 14 variant GES již bylo identifikováno. GES-14 byla popsána u *Acinetobacter baumannii*, izolátu z roku 2008 v Belgii. Jednotlivé varianty se od sebe liší na úrovni hydrolyzačního spektra (Bogaerts et al., 2010).

Přestože jsou tyto enzymy poměrně vzácné, tak jejich výskyt, byť většinou ojedinělý, byl hlášen z celého světa (Giakkoupi et al., 2000; Poirel et al., 2000a; Wachino et al., 2004; Bogaerts et al., 2010)

3.2.1.2. KPC

Karbapenemázy typu KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) se vyskytují na různých přenosných plazmidech, většinou v přítomnosti jedné z izoforem transpozonu Tn4401, což je důvodem celosvětového rozšíření tohoto genu rezistence (Cuzon et al., 2010).

Gen *bla*_{KPC-1} byl poprvé popsán v roce 2000 v USA u *Klebsiella pneumoniae*. Poskytoval rezistenci na imipenem, meropenem, širokospektré cefalosporiny i aztreonam. Z biochemických studií vyšlo, že je inhibován jak tazobaktamem, tak klavulanovou kyselinou (Yigit et al., 2001).

Bylo rozlišeno 10 variant KPC, z nich nejčastější jsou KPC-2 a KPC-3. V Evropě je dominantní KPC-2 varianta (Nordmann et al., 2009).

Zpočátku se zdálo, že je výskyt omezen jen na čeleď *Enterobacteriaceae*, ale pak byly nahlášeny výskyty i u *Pseudomonas aeruginosa* a rodu *Acinetobacter* (Villegas et al., 2007, Robledo et al., 2010).

Klebsiella pneumoniae je častým nozokomiálním patogenem a je zároveň nejběžnějším multirezistentním patogenem, což je většinou důsledkem přítomnosti právě KPC (viz 4.3.1.). (Landman et al., 2007)

3.2.1.3. SME

Karbapenemáza typu SME-1 byla poprvé detekována v Anglii u dvou izolátů *Serratia marcescens* izolovaných v roce 1982 (Yang et al., 1990; Naas et al., 1994). Doposud byly

popsány 3 téměř identické varianty SME, které se sporadicky objevily v různých oblastech Spojených států (*Queenan et al., 2006*). SME produkující *S.marcescens* z různých geografických oblastí nejsou identické, což bylo prokázáno pulzní elektroforézou – nejedná se tedy o klonální rozšíření. Není však vyloučeno klonální šíření v rámci jednotlivých oblastí (*Troillet et al., 1999*).

Doposud se zdá, že výskyt SME je jen v rámci druhu *Serratia marcescens*. Geny pro enzymy rodiny SME se nachází na chromozómu. Nejpríbuznější jsou jí enzymy z rodiny NMC. Stejně jako ostatní chromozomální karbapenemázy z molekulární třídy A obsahují konzervované cysteinové zbytky v pozicích 69 a 238, které tvoří disulfidický můstek v blízkosti aktivního místa enzymu (*Naas et al., 1994; Mataseje et al. 2012*).

3.2.1.4. IMI/NMC-A

Karbapenemázy typu IMI a NMC-A se preferenčně vyskytují u *Enterobacter cloacae*, ale i tyto výskyty jsou poměrně vzácné (*Nordman et al., 1993*). IMI-1 a NMC-A enzymy jsou více jak z 95 % identické na úrovni aminokyselinové sekvence. Nejpodobnější jim je SME-1 se 70% identitou aminokyselinové sekvence (*Rasmussen et al., 1996*). O mobilitě genu *bla_{IMI}* se stále ještě nemluví s jistotou, přestože je ohraničen transpozonem podobným transpozonu Tn903, tak přenos prokázán nebyl (*Yu et al., 2006*).

3.2.2. Karbapenemázy molekulární třídy B

První metalo- β -laktamázy byly popsány u environmentálního a oportunně patogenního druhu *Bacillus cereus*. Identifikace Zn^{2+} jako nutného kofaktoru cefalosporinázové aktivity u kultury *B.cereus*, která se vyskytovala vedle penicilinázové aktivity, vedla k odlišení tohoto enzymu (*Sabath and Abraham, 1966; Kuwabara et al., 1967*). Následovaly nálezy β -laktamáz závislých na přítomnosti zinku u *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila* aj (*Saino et al., 1982; Shannon and Abraham, 1986*). Všechny tyto výskyty byly ojedinělé a enzymy byly produkty chromozomálních genů. V roce 1991 byla nahlášena MBL u *Pseudomonas aeruginosa*, která byla kódována genem na plazmidu a posléze byly identifikovány další bakteriální druhy s enzymy kódovanými na přenosných elementech (*Arakawa et al., 1995; Bandoh et al., 1992; Lauretti et al., 1999; Watanabe et al., 1991*). MBL mají širokou substrátovou specifitu a v zásadě hydrolyzují všechny β -laktamy mimo monobaktamy (*Garau et al., 2004*).

Všechny MBL patří do molekulární třídy B, která není strukturně příbuzná ostatním třídám β -laktamáz, které mají v aktivním místě serin. V aktivním místě mají konzervovanou sekvenci His-X-His-X-Asp, motiv vážící zinečnaté ionty. V rámci třídy B jsou i enzymy

navzájem si nepříbuzné, proto se ještě rozděluje do podtříd B1, B2 a B3. B1 a B2 sdílí do určité míry sekvenční homologii, ale skupina B3 je výrazně odlišná (Hall and Barlow, 2005).

MBL tvoří podle Bushe funkční skupinu 3, která je vyčleněna hlavně na základě inhibice chelátory divalentních kovových iontů a absencí inhibice klavulanovou kyselinou, sulbaktamem či tazobaktamem (Bush, 1998). Na základě odlišností substrátové specifity bývá tato skupina ještě dále rozdělována na 3 podskupiny. Skupina 3a hydrolyzuje peniciliny rychleji nebo stejně rychle jako hydrolyzuje imipenem, skupina 3b zahrnuje „pravé karbapenemázy“ s vysokou specifitou pro hydrolyzu karbapenemů a skupina 3c má vysokou cefalosporinázovou aktivitou. Rozdělení na tyto podskupiny – 3a, 3b, a 3c odpovídá podskupinám B1, B2, B3 rozdělených podle odlišností na úrovni sekvence DNA a je podpořeno krystalografickými studiemi (Rasmussen and Bush, 1997).

B2 enzymy jsou převážně nacházeny u rodu *Aeromonas* a B3 enzymy u několika různých environmentálních druhů (Walsh et al., 1996; Walsh et al., 2005).

Skupina B1 zahrnuje MBL nejvíce rozšířené, často získané a proto se vyskytující u mnoha bakteriálních druhů. Patří sem IMP, VIM, NDM a méně časté SPM, GIM, SIM, KHM, DIM aj. (Bebrone, 2007; Poirel et al, 2010; Sekiguchi et al., 2008; Yong et al., 2009). Lokalizace genů pro tyto enzymy na přenosných elementech má za následek možnost jejich rychlejšího šíření mezi bakteriemi, a tak pravděpodobnost jejich nálezu u nejrozličnějších patogenů v porovnání s chromozomálně kódovanými geny vzrůstá. Nejběžnější MBL rodiny zahrnují právě VIM, IMP a NDM enzymy, které jsou inkorporovány jako genové kazety do integronových struktur. IMP a hlavně NDM a VIM se stále rozšiřují celosvětově, ostatní enzymy rodiny B1 převážně zůstávají v zemích původu (Queenan et al., 2007).

3.2.2.1. IMP

První detekovaná MBL na přenosném elementu byla IMP-1 u *Pseudomonas aeruginosa* v Japonsku. Tento bakteriální kmen rezistentní na imipenem byl izolován již v roce 1988, ale teprve v roce 1991 byla rezistence přisouzena nové β -laktamáze produkované transferabilním plazmidem pMS350 (Watanabe et al., 1991). Provedené genetické studie genu *bla_{IMP}* u imipenem rezistentního kmene *Serratia marcescens*, izolovaném v Japonsku v roce 1993 u pacienta s infekcí močových cest, ukázaly na jeho pozici na integronu přítomném na velkém transferabilním plazmidu a možnost jeho přenosu z plazmidu na chromozom (Arakawa et al., 1995).

Přestože již bylo identifikováno 27 derivátů IMP, tak globální scénu MBL nikdy neovládly a jsou spíše záležitostí malých epidemií. Jen v Japonsku zůstává IMP-1 dominantním determinantem rezistence i 20 let po jeho prvním objevení (Ode et al., 2009).

Všechny varianty MBL typu IMP se nachází na integronech třídy 1 nebo 3, není však většinou jasné, zda samotné integrony jsou spojeny s plazmidem či jsou chromozomální, protože tato data poskytuje jen málo studií. Integrony jsou ohraničeny transpozony, konkrétně Tn21 a Tn5051, které jsou zodpovědné za jejich přenos (Toleman *et al.*, 2005).

3.2.2.2. VIM

VIM je zkratkou pro „Verona integron-encoded metallo- β -lactamase“. Název dostal tento enzym podle místa prvního nálezu – italské Verony. Konkrétně gen pro VIM-1 byl identifikován jako genová kazeta integronu první třídy přítomným na chromozomu karbapenem rezistentní *Pseudomonas aeruginosa*, zodpovědné za vzplanutí nozokomiálních infekcí ve Verona University Hospital z roku 1997 (Lauretti *et al.*, 1999). Následně byl nahlášený enzym VIM-2 z Francie z izolátu *Pseudomonas aeruginosa* z roku 1996 (Poirel *et al.*, 2000b). Právě VIM-2 je tím dominantním ze všech 25 různých VIM variant. Většina VIM-2 se vyskytuje u *P. aeruginosa*, časté příčiny nozokomiálních infekcí (Cardoso *et al.*, 2008).

3.2.2.3. NDM

„New Dehli metallo- β -lactamase“ byla popsána teprve v roce 2008 u *Klebsiella pneumoniae* v Indii (Yong *et al.*, 2009). Již o dva roky později bylo zaznamenáno její rozšíření po celém světě mezi zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (Mazzariol *et al.*, 2012; Solé *et al.*, 2011). Plazmid, který je zodpovědný za šíření NDM-1 nese také další geny rezistence, a to k makrolidům, aminoglykosidům, sulfamthoxazolu a také k aztreonamu (Yong *et al.*, 2009).

3.2.2.4. MBL s omezeným geografickým výskytem

Karbapenemáza typu SPM byla poprvé izolována z *Pseudomonas aeruginosa* v Brazílii v Sao Paulu. V Brazílii způsobila několik menších epidemií v nemocnicích spojených s vysokou úmrtností. Genetické analýzy okolí genu *bla_{SPM-1}* zjistily, že není součástí integronu, ale je asociován s běžnými oblastmi obsahujícími nový typ transponabilní struktury (Poirel *et al.*, 2004b). Obsah GC párů na hladině 47 % indikuje, že SPM-1 není původem z *P. aeruginosa*, kde je zastoupení GC párů 67%. Výskyt SPM se zdá být omezen na Latinskou Ameriku. (Toleman *et al.*, 2002).

Karbapenemáza typu GIM byla izolovaná v Německu v roce 2002 od pěti pacientů. Tato získaná MBL byla identifikována u klonálních isolátů *Pseudomonas aeruginosa* na plazmidu v rámci integronu třídy 1. S IMP jeví homologii v aminokyselinové sekvenci 43 %, 30 % s VIM a s SPM 29 % (Castanheira *et al.*, 2004). Žádná jiná země než Německo zatím její výskyt nepublikovala.

Karbapenemáza typu SIM je velmi podobná rodině IMP (64 - 69 % aminokyselinová identita u SIM-1). Poprvé byl tento MBL enzym popsán u izolátů *Acinetobacter baumannii* v Korei a jeho geografický výskyt se zdá být zatím omezen na tuto oblast. Gen *bla*_{SIM-1} byl identifikován jako genová kazeta integronu třídy 1 (Lee et al., 2005).

Izolát *Pseudomonas stutzeri* z roku 2007 od pacienta v Amsterdamu byl pozitivní na produkci metalo- β -laktamázy. Po genetických analýzách byla popsána nová MBL DIM-1. Na úrovni aminokyselinové sekvence je tato MBL nejvíce podobná GIM-1 (52 %). Obsah GC párů ukazuje na horizontální transfer genu kódující tento enzym, protože je o 20 % nižší než je u druhu *P. stutzeri* obvyklé (Poirel et al., 2010).

KHM-1 enzym nalezený u japonského izolátu *Citrobacter freundii* z roku 1997 má 59% identitu aminokyselinové sekvence s IMP-1 i SIM-1 a je kódovaný na plazmidu. Ze zastoupení GC párů v oblasti kódující KHM-1 enzym je patrné, že není původem z druhu *C. freundii*. Blízké okolí genu *bla*_{KHM} neukazuje na známky místně specifické kointegrace ani na přítomnost transferabilních elementů (Sekiguchi et al., 2008).

3.2.3. Karbapenemázy molekulární třídy D

Třída D β -laktamáz je označována také jako OXA, což plyne z její původní definice. Většina těchto enzymů hydrolyzovala oxacilin rychleji než klasické peniciliny. V aktivním místě mají serin, stejně jako enzymy z molekulárních tříd A a C. Jsou skupinou s největší diverzitou, jak na biochemické tak na genetické úrovni. Nejsou inhibovány klasickými inhibitory β -laktamáz. Bodovými mutacemi v aminokyselinové sekvenci vznikly také enzymy s rozšířeným spektrem hydrolýzy o cefalosporiny či karbapenemy (Naas and Nordmann, 1999).

Nejčastějšími ESBL OXA typu jsou deriváty OXA-10 a OXA-15. Karbapenemázovou aktivitu pak vykazuje množství OXA enzymů. V roce 2006 bylo známo na 121 různých variant OXA β -laktamáz a z nich 45 vykazovalo karbapenemázovou aktivitu. Karbapenem hydrolyzující enzymy třídy OXA byly rozděleny do devíti podskupin. Sekvenční identita mezi členy jedné skupiny je více jak 92 %. Mezi enzymy patřícími do různých karbapenemázových skupin je to pak 40 - 70 % (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2006; Schneider et al., 2006).

OXA karbapenemázy jsou nejrozšířenější u druhu *Acinetobacter baumannii* (Afzal-Shah and Livermore, 1998). První OXA β -laktamáza s karbapenemázovou aktivitou ARI-1 byla popsána v roce 1993 u izolátu multirezistentního kmene *A. baumannii*, získaného v roce 1985 od pacienta ve Skotsku (Paton et al., 1993). Po sekvenčních analýzách tohoto na plazmidu

kódovaného enzymu, bylo jeho označení změněno na OXA-23, reprezentující jeho zařazení do OXA rodiny. Jeho výskyt se zdá být omezen na rod *Acinetobacter* a nepředpokládá se jeho horizontální šíření do jiných bakteriálních rodů. U *A. baumannii* bývají identifikovány také transferabilní skupiny enzymů OXA-58 a OXA-40. Další transferabilní OXA karbapenemázou je OXA-48 často v rámci *Enterobacteriaceae* (Donald et al., 2000; Nemec et al., 2011).

Samotné karbapenemázy této skupiny vykazují poměrně nízkou karbapenemázovou aktivitu, ale bývají často podpořeny dalšími mechanizmy rezistence, jako je zvýšená exprese efluxových pump či snížený influx antibiotik (Heritier et al., 2005).

3.2.4. Karbapenemázy v České republice

Karbapenemázy se v České republice vyskytují spíše sporadicky, ale přesto jejich počet vzrůstá. První publikovaná zmínka o karbapenemázách v České republice je z roku 2009 a jedná se o IMP-7 karbapenemázu u kmene *Pseudomonas aeruginosa* izolovaného v roce 2008 (Hrabák et al., 2009a). V roce 2010 byl publikován nález stejného typu karbapemázy také u kmene *P. aeruginosa* izolovaného již v roce 2007 (Nemec et al., 2010). U stejného druhu došlo zanedlouho k rozšíření VIM-2. Mezi enterobakteriemi se jedná o ojedinělé nálezy VIM u dvou izolátů *Serratia marcescens* a dvou izolátů rodu *Enterobacter*. U druhu *Klebsiella pneumoniae* došlo k zaznamenání dvou případů importu KPC z Řecka (KPC-2) a Itálie (KPC-3) (Hrabák et al., 2011a). Multirezistentní *Acinetobacter baumannii* nesoucí geny pro karbapenemázy NDM-1 a OXA-23 importovaný do České republiky z Egypta byl popsán v roce 2011 (Nemec et al., 2011).

4. Karbapenemázy u nozokomiálních patogenů

Infekce získané během pobytu v nemocnici, tj. které nebyly přítomny před přijetím do nemocnice a v době přijetí do nemocnice se pacient ani nenacházel v inkubační době, jsou označovány jako nozokomiální (Garner et al., 1988). Jsou označovány také jako „hospital acquired infections“ (infekce získané v nemocnici) nebo „health care-associated infections“ (infekce spojené se zdravotnickou péčí). Podle zdroje infekce se rozlišují exogenní a endogenní nozokomiální infekce. Endogenní infekce vznikají zavlečením infekčního agens z kolonizovaného místa na jiné místo téhož makroorganismu. Exogenní infekce vznikají zavlečením infekčního agens z vnějšího prostředí, což bývá méně časté. Rezervoárem exogenních infekcí mohou být například ostatní pacienti, nemocniční personál nebo zdravotnické vybavení. Nozokomiální infekce jsou významnou komplikací při léčbě

hospitalizovaných pacientů po celém světě, protože mohou významně prodloužit pobyt v nemocnici a být kritickou hrozbou například pro pacienty na jednotkách intenzivní péče (Jarvis et al., 1991; Kappstein et al., 1992). Naneštěstí bývají původcem nozokomiálních infekcí často organizmy multirezistentní, což ještě dále komplikuje léčbu (Onguru et al., 2008)

Nejčastěji nozokomiální infekce zasahují dolní dýchací cesty (např. pneumonie u pacientů na umělé plicní ventilaci), následují infekce močových cest (např. u pacientů se zavedeným močovým katetrem), krevního oběhu (u pacientů se zavedeným centrálním žilním katetrem) a gastrointestinálního traktu a infekce v místě chirurgického výkonu (Ding et al., 2009).

Mezi nejčastější nozokomiální patogeny u pacientů z jednotek intenzivní péče patří *Staphylococcus aureus* (zvláště epidemiologicky významný MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*, *Enterococcus* spp. a z čeledi *Enterobacteriaceae* jsou to *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp a *Escherichia coli* (Geffers and Gastmeier, 2010). Níže jsou jako příklad uvedeni tři zástupci původců nozokomiálních infekcí s častějším výskytem karbapenemáz.

4.1. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii je významným patogenem ve zdravotnických zařízeních. Na rozdíl od většiny ostatních klinicky důležitých bakterií, má schopnost velmi rychle získat geny antibiotické rezistence, což vede k jeho multirezistenci (Bérézín and Towner, 1996). Patří z hlediska rezistence k antibiotické léčbě mezi nejproblematictější gramnegativní bakterie. Přežívá většinu změn v prostředí a vydrží dlouhou dobu na povrchu různých zdravotnických pomůcek (Das et al., 2002; Maragakis et al., 2004)

Rezistence u bakterií rodu *Acinetobacter* se v posledním desetiletí významně zvýšila. Mají poměrně nepropustnou zevní membránu a jejich prostředí, v němž přirozeně žijí, jim zároveň slouží jako velký rezervoár rezistentních genů. Nárůst rezistence je, kromě šíření rezistentních kmenů mezi pacienty, také spojován se selektivním tlakem vytvořeným používáním širokospektrých antibiotik včetně karbapenemů (Lee et al., 2004).

Infekce způsobená rodem *Acinetobacter* je většinou léčena karbapenemy, pokud je tedy zachována citlivost k této skupině antibiotik. Výsledky týkající se účinnosti imipenemu a meropenemu se liší. Efluxové pumpy jsou výkonnější při odstraňování meropenemu, zatímco některé specifické β -laktamázy hydrolyzují účinněji imipenem (Díez et al., 2004).

Zástupci rodu *Acinetobacter* mohou produkovat β -laktamázy hydrolyzující peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy. V rámci karbapenemáz se nejčastěji jedná o OXA enzymy

(Amudhan *et al.*, 2011). Jedná se o oxacilinázy typu OXA-23, OXA-24, OXA-58 a chromozomální OXA-51 jehož exprese je za normálních okolností poměrně nízká (Hu *et al.*, 2007; Nemec *et al.*, 2008). Byly také popsány výskyty MBL, konkrétně VIM a IMP, ale také NDM. Výskyty karbapenemáz u *Acinetobacter* nejsou ojedinělé, jsou hlášeny z celého světa včetně České republiky (Thomson and Bonomo, 2005; Nemec *et al.*, 2011).

4.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je dalším patogenem, který může ve zdravotnickém zařízení způsobovat těžké nozokomiální infekce. Je příčinou 10 - 15 % nozokomiálních infekcí ve světě (Blanc *et al.*, 1998). *P. aeruginosa* mj. zodpovídá za plicní infekce pacientů s cystickou fibrózou. Je příčinou 17 % pneumonií získaných v nemocnici a patří také mezi nejběžnější organizmy objevující se u infekcí krevního oběhu. Je často zmiňována v souvislosti s popáleninovými traumaty. Jedinečnost problematiky tohoto bakteriálního rodu spočívá v kombinaci mnoha faktorů, jako jsou zděděné faktory rezistence, četné mutace vedoucí k novým rezistencím (tzv. hypermutátorové kmeny) a častá role původců závažných infekčních onemocnění (Thomson and Bonomo, 2005).

Nízká permeabilita vnější membrány, stálá exprese různých efluxových pump s širokou substrátovou specifikou a přirozená produkce inducibilní AmpC β -laktamázy jsou základní faktory rezistence u *P. aeruginosa*. K tomu se přidává množství získaných rezistentních mechanismů, jako jsou některé β -laktamázy, které *P. aeruginosa* poměrně lehce nabývá. *P. aeruginosa* může produkovat β -laktamázy i z několika molekulárních tříd současně. Inducibilní AmpC β -laktamáza, přítomná u tohoto rodu, inaktivuje většinu penicilinů a cefalosporinů, které její produkci indukovaly (Livermore, 1992). Enzymy z molekulární třídy A a D, které se mohou vyskytovat u *P. aeruginosa*, pak doplňují rezistenci o karbenicilin, piperacilin, ceftazidim, cefepim a aztreonam (Philippon *et al.*, 1997; Vahaboglu *et al.*, 1997). Největší klinickou důležitost mají MBL, konkrétně IMP a VIM, které rozšiřují spektrum rezistence i o karbapenemy (Lee *et al.*, 2004).

4.3. *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae jsou hojné symbiotické mikroorganismy u člověka, ale zároveň patří mezi nejčastější původce bakteriálních infekcí u lidí všech věkových kategorií. Mezi nejčastější nozokomiální patogeny z čeledi *Enterobacteriaceae* patří rod *Enterobacter* a druhy *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* a *Escherichia coli* (Gaynes *et al.*, 2005).

Od osmdesátých let se zvyšovaly počty zástupců *Enterobacteriaceae* produkujících ESBL. Na léčbu infekcí způsobených bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae*, které se staly v mnoha případech multirezistentní, se začaly využívat karbapenemy stabilní vůči většině β -laktamáz včetně ESBL. Časté předepisování karbapenemů v těchto případech vzbuzuje obavy ze vzniku a šíření rezistence (Hawkey, 2008). Rezistence na karbapenemy v rámci této čeledi byla dříve jen díky větší produkci AmpC či ESBL u organismů s mutovanými poriny (Bradford et al., 1997). Pak se objevily karbapenemázy šířící se mezi zástupci *Enterobacteriaceae* a ohrožující léčbu infekcí jimi způsobených (Leavitt et al., 2007). Karbapenemázy vyskytující se u této čeledi jsou zejména enzymy KPC, klinicky i epidemiologicky nejdůležitější. Z molekulární třídy A pak ještě enzymy SME, NMC-A/IMI a GES a také VIM, IMP a NDM z molekulární třídy B a OXA-48 z molekulární třídy D (Gupta et al., 2011; Poirel et al., 2004a; Yong et al., 2009). V České republice byly popsány případy KPC a VIM produkujících *Enterobacteriaceae* (Grundmann et al., 2010)

4.3.1. *Klebsiella pneumoniae*

Rod *Klebsiella* zahrnuje oportunní patogeny. Nozokomiální infekce způsobené rodem *Klebsiella* jsou hlavně zapříčiněny druhem *Klebsiella pneumoniae*, v mnohem menší části případů se jedná o druh *Klebsiella oxytoca*. V Evropě a Spojených státech amerických se odhaduje, že asi 8 % nozokomiálních infekcí je způsobeno tímto rodem. Z hlediska šíření a získávání nových genů je *Klebsiella* v rámci *Enterobacteriaceae* nejproblematictější rodem. (Podschun and Ullmann, 1998).

Klebsiella pneumoniae produkuje karbapenemázy nejčastěji typu KPC. Poprvé byla KPC detekována v roce 2001 v Severní Karolíně ve Spojených státech amerických právě u tohoto druhu (Yigit et al., 2001). Mimo USA byly infekce způsobené KPC produkující *Klebsiella pneumoniae* zaznamenány až v roce 2005 ve Francii a jejich původ byl vysledován do USA (Naas et al., 2005).

Nárůst případů rezistence na karbapenemy je signifikantní. Ve spojených státech došlo ke zvýšení počtu meropenem rezistentních kmenů *Klebsiella pneumoniae* z 0,6 % v roce 2004 na 5,6 % v roce 2008 (Rhomborg and Jones, 2009).

5. Detekce karbapenemáz

Detekce organismů produkujících karbapenemázy se v mikrobiologické laboratoři stává důležitou součástí diagnostiky, protože počet mikroorganismů se schopností hydrolyzovat tyto enzymy, zejména mezi gramnegativními bakteriálními patogeny, stále vzrůstá. Samotná

jejich detekce není snadná a nejde se spoléhat jen na samotné profily rezistence získané při běžných testech citlivosti k antibiotickým preparátům. Produkce karbapenemáz se může projevit rezistentním fenotypem, ale záleží na bakteriálním druhu, úrovni exprese, typu tohoto enzymu a přítomnosti dalších rezistentních mechanismů (*Landman et al., 2009; Queenan and Bush, 2007*).

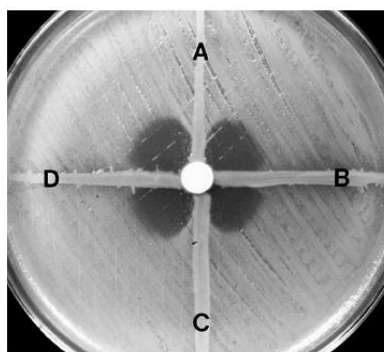
Kultury vykazující výrazně zvýšené MIC pro karbapenemy nebo zmenšené inhibiční zóny při diskovém difuzním testu by měly být podrobeny specifitějšímu testování na přítomnost karbapenemáz (*Miriagou et al., 2010*).

5.1. Fenotypové testy

V laboratořích klinické mikrobiologie se většina testů na detekci β -laktamáz spoléhá na fenotypové metody, které vycházejí ze substrátové specifity a citlivosti k inhibitorům. Umožňují na rozdíl od molekulárně genetických metod zjištění stupně rezistence. To platí i při zjišťování karbapenemáz (*Hrabák et al., 2009b*).

Typicky se rezistence na karbapenemy potvrzuje nejdříve zjišťováním MIC či inhibičních zón pro karbapenemy a následně specifitější detekcí přítomnosti karbapenemáz. Modifikovaný Hodgeův test (MHT), označovaný také jako „clover leaf method“ (čtyřlístková metoda) je založen na inaktivaci karbapenemu narostlou bakteriální kulturou nebo buněčnými extrakty organismů produkujících karbapenemázy. To umožní citlivému indikátorovému kmeni růst směrem k disku s karbapenemem souběžně s rezistentní testovanou kulturou (obr. 2). Tímto testem nedojde ke zjištění typu karbapenemázy (*Lee et al., 2000*). Vyskytují se také falešně pozitivní výsledky a může být problém s identifikací slabých producentů karbapenemáz (*Carvalhaes et al., 2009*).

Obr. 2 MHT – Použitý indikátorový kmen *E.coli* citlivý na imipenem; A, C jsou kmeny hydrolyzující imipenem (disk s imipenemem umístěn uprostřed plotny), a narušují tak inhibiční zónu citlivého indikátorového kmene, B, D kmeny imipenem nehydrolyzují, a proto inhibiční zónu neovlivňují. Převzato z *Lee et al., 2000*.



Na specifické testování MBL producentů se používají testy spočívající v synergii inhibitoru MBL, což je například EDTA a 2-merkaptopropionová kyselina, a β -laktamové složky, což bývá karbapenem nebo ceftazidim. Tyto testy využívají závislost MBL na zinečnatých iontech a používají chelátory k inhibici β -laktamové hydrolýzy (*Lee et al., 2000, Arakawa et al., 2000*). Mezi testy založené na synergii inhibitoru s karbapenemem je založen například E-test pro MBL. E-test je diagnostický proužek na kterém se snižuje koncentrace antibiotika a vytváří se kapkovitá zóna inhibice růstu. V místě kde „kapka“ protíná proužek se odečítá MIC. E-test pro MBL spočívá v rozdílech MIC pro imipenem a imipenem s EDTA (*Walsh et al., 2002*). Přestože testy s inhibitory jsou obecně dobrým způsobem pro detekci MBL, tak se mohou vyskytovat i falešně pozitivní nebo nejasné výsledky. Inhibitory MBL účinkují nespecificky a ovlivňují i další struktury a procesy než MBL (*Chu et al., 2005*).

Na testování karbapenemáz ze skupiny 2f podle Bushe neexistují příliš spolehlivé metody detekce. Pro rutinní vyhledávání podezřelých kmenů se osvědčil ertapenem jako indikátorové antibiotikum (například pro MIC, diskovou citlivost) (*Hrabák et al., 2009b*). Jako konfirmační test se pak může použít srovnání inhibičních zón samotného karbapenemu a karbapenemu s přídatkem kyseliny borité, která je inhibitorem KPC. Pokud je inhibiční zóna kolem disku s kyselinou boritou větší o 5 a více milimetrů než kolem disku bez ní, může se jednat o produkci právě KPC (*Tsakris et al., 2009*).

5.2. Molekulární testy

Do molekulárních metod se řadí molekulárně genetické metody detekce a dále sem mohou být v širším pojetí zařazeny různé metody založené na spektrometrickém určování přítomnosti karbapenemáz. Klasické fenotypové testy je často lépe potvrdit další metodou ať už spektrometrií nebo PCR, protože se mohou při jejich provedení vyskytovat falešně pozitivní i falešně negativní výsledky. Molekulárně genetické metody detekce pak navíc poskytují možnost určení přesného typu či varianty karbapenemázy a jejího šíření pro epidemiologické účely (*Hrabák et al., 2009b*).

V poměrně nedávné době se zavedla detekce aktivity karbapenemáz pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Tento přístup je založen na zjištění molekulových hmotností chemických složek ve vzorku, který byl inkubován s meropenemem. Zjistí se přítomnost či absence peaků odpovídajících molekulárním hmotnostem meropenemu, jeho solí a degradačního produktu a odvodí se tak přítomnost či absence aktivních karbapenemáz (*Hrabák et al., 2011b*).

Metoda podobná MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii je spektrofotometrická analýza degradace imipenemu. Vyžaduje zdlouhavější přípravu. Je třeba připravit bezbuněčný bakteriální extrakt (*Pasteran et al., 2009*).

Molekulárně genetické metody pro detekci genů karbapenemáz zahrnují klasickou PCR, multiplex i real-time PCR, DNA hybridizaci a sekvenování. Na rozdíl od ostatních zmíněných metod poskytují možnost specifického určení typu i varianty karbapenemáz. PCR je nejrychlejším způsobem určení, do které rodiny daná karbapenemáza patří.

Multiplex PCR spočívá v přítomnosti více dvojic primerů pro různé geny. Podmínky jsou optimalizované tak, aby došlo pomocí primerů k amplifikaci všech přítomných genů. Vyhodnocení se provádí klasickou elektroforetickou metodou, při které se podle délky produktu určí, o který gen se jedná. Multiplex je tedy proti jednoduchému PCR (klasické PCR s jednou dvojicí primerů) rychlejším způsobem detekce, ale optimalizace je mnohem složitější. Byly již publikovány například optimalizované podmínky pro multiplex PCR detekci převládajících OXA karbapenemáz u *Acinetobacter* spp a pro detekci získaných karbapenemáz z různých skupin (*Poirel et al., 2010; Woodford et al., 2006*).

Některé laboratoře využívají „colony blot hybridization“ pro screening většího množství izolátů podezřelých na přítomnost genů pro karbapenemázy (*Yan et al., 2001*). Hybridizační techniky se ve spojení se Southern blotem používají pro určení plazmidového či chromozomálního umístění genů karbapenemáz (*Lolans et al., 2006*).

6. Zahájení pilotní studie detekce karbapenemáz Fakultní nemocnice v Motole

Fakultní nemocnice v Motole je největším zdravotnickým zařízením v České republice a svým významem a kvalitou poskytované péče se řadí na přední místa mezi nemocnicemi v ČR. Poskytuje komplexní péči díky existenci mnoha ošetrovatelských a specializovaných lékařských týmů z mnoha oborů. Nachází se zde ambulantní i lůžková část pro děti, dospělé a seniory. Pokrývá běžnou lékařskou péči, ale také péči specializovanou a superspecializovanou. Právě díky výrazné specializaci, zejména v oblasti pediatrie, je také vyhledávaným cílem zahraničních pacientů (*informace převzaté z www.fnmotol.cz*). Velikost nemocnice a nabízená vysoce specializovaná péče předznamenává, že se tu mj. soustředí léčba pacientů se závažnými diagnózami, jako např. nemocných s polytraumaty nebo se vzácnými, chronickými onemocněními. To v sobě zahrnuje vyšší riziko výskytu

doprovodných nozokomiálních infekcí a vyšší riziko výskytu multirezistentních mikroorganismů.

Přestože byly ve Fakultní nemocnici v Motole zaznamenány případy bakteriálních kmenů produkujících karbapenemázy, zdejší klinická mikrobiologická laboratoř prozatím nedisponuje technikami, které by dovolovaly jejich jednoznačnou detekci (*Nemec et al., 2011*). Spolupracuje s referenční laboratoří při Fakultní nemocnici v Plzni, do které posílá k finální identifikaci kmeny se suspekci na produkci karbapenemáz. Od března roku 2012 zavádí pracoviště ve Fakultní nemocnici v Motole detekci karbapenemáz pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Zároveň pro potvrzení a určení typu karbapenemáz zavádí Laboratoř molekulární genetiky při Ústavu lékařské mikrobiologie FN v Motole PCR pro vybrané geny karbapenemáz.

6.1. Detekce vybraných karbapenemáz pomocí PCR

Cílem pregraduální laboratorní činnosti předkladatelky této bakalářské práce je implementovat metodu PCR k detekci nejčastějších typů karbapenemáz v Laboratoři molekulární genetiky na Ústavu lékařské mikrobiologie FN v Motole. V tomto okamžiku se práce nachází ve fázi kompletního nastavení a zprovoznění PCR, čímž je metoda připravena k zahájení testování klinických izolátů na přítomnost genů pro vybrané typy karbapenemáz.

Po vzoru laboratoře Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty UK v Plzni, jejímž vedoucím je Ing. Jaroslav Hrabák Ph.D., a v úzké spolupráci s tímto pracovištěm jsme nejprve zahájili optimalizaci PCR pro geny IMP, VIM, NDM a KPC. Primery pro tyto geny už byly několikrát navrženy a publikovány, proto jsme se rozhodli pro použití již vyzkoušených primerů.

Primery pro geny IMP a VIM vycházejí z publikace M. J. Ellingtona a dalších (*Ellington et al., 2007*). Vzniklé produkty s použitím těchto primerů mají mít délku 188 párů bazí pro IMP a 390 pro VIM. Pro detekci genů kódujících rodinu KPC enzymů jsme využili návrhy primerů z článku T. Naase *et al.* z roku 2008 (*Naas et al., 2008*); amplifikovaný DNA produkt má délku 796 bp. Sekvenci primerů pro detekci genu kódujícího karbapenemázu NDM-1 jsme převzali z článku od Y. Pfeifer *et al.* z roku 2011 (*Y. Pfeifer et al., 2011*). V tomto případě je délka produktu 753 bp

Pro optimalizaci PCR těchto genů jsme využili pozitivní kontroly poskytnuté pracovištěm v Plzni, zahrnující 3 kmeny *Klebsiella pneumoniae* (jeden produkující VIM a dva KPC karbapenemázy), 1 kmen *Pseudomonas aeruginosa* pozitivní zároveň na VIM a IMP, 1 kmen

Serratia marcescens pozitivní na VIM a 1 kmen *Acinetobacter baumannii* produkující NDM1 karbapenemázu.

Výsledné protokoly po optimalizování podmínek PCR jsou uvedeny v tabulce 3. Použité Podmínky PCR pro geny IMP a VIM jsou vhodné i pro multiplex PCR.

Tab. 3 PCR podmínky pro geny VIM, IMP, KPC, NDM, reakční směs a cykly v termocykleru.

gen	Primery (přední – P, reverzní – R)	reakční směs - finální koncentrace	objem v reakční směsi 20μl	termocykler
VIM	P: 5'-GAT GGT GTT TGG TCG CAT A-3' R: 5'-CGA ATG CGC AGC ACC AG-3'	pufr: 1x MgCl ₂ : 2mM dNTP: 0,2 mM primery: 0,4 μM polymeráza: 1U/ μl DNA ~0,2 μg/ μl	pufr(5x): 4 μl MgCl ₂ (25 mM): 0,4 μl dNTP (5 mM): 0,8 μl prim. (20 μM): 0,4 μl polymeráza: 0,2 μl DNA: 1 μl	94 °C – 5 min 30x (94 °C – 30 s, 55 °C – 40 s, 72 °C – 30 s), 72 °C – 5 min
IMP	P: 5'-GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C-3' R: 5'-CCA AAC YAC TAS GTT ATC T-3'			
KPC	P: 5'-CTG TCT TGT CTC TCA TGG CC-3' R: 5'-CCT CGC TGT GCT TGT CAT CC-3'	pufr: 1x MgCl ₂ : 1,5 mM dNTP: 0,2 mM primery: 0,4 μM polymeráza 1 U/ μl DNA ~0,2 μg/ μl	pufr (5x): 4 μl dNTP (5 mM): 0,8 μl prim. (20 μM): 0,4 μl pol. (U.μl ⁻¹): 0,2 μl DNA: 1 μl	94 °C – 5 min 30x (94 °C – 30 s, 65 °C – 40 s, 72 °C – 50 s), 72 °C – 5 min
NDM	P: 5'-CTG AGC ACC GCA TTA GCC-3' R: 5'-GGG CCG TAT GAG TGA TTG C-3'			

pozn.: použitý pufr (1x) obsahuje 1,5mM koncentraci MgCl₂,

Během přípravy celého protokolu jsme zaznamenali problém v souvislosti s vyhodnocováním pomocí gelové elektroforézy, protože délky produktů se jevíly kratší, než by ve skutečnosti být měly. Sekvenováním jsme však ověřili, že se amplifikovaly správné produkty požadované délky. Problém jsme nakonec identifikovali v samotné elektroforéze. Používané fluorescenční barvivo GelRed (od firmy Biotium) přidávané do agarózového gelu, které se váže na nukleové kyseliny, značně ovlivňuje putování některých fragmentů DNA v gelu. Potvrdili jsme to srovnáním 2 elektroforetických gelů vytvořených za stejných podmínek, jeden však s použitím Ethidium bromidu (EtBr) a druhý se zmiňovaným barvivem. V gelu, kde se na DNA navázal EtBr, došlo k doputování fragmentů DNA do vzdálenosti odpovídající jejich délce. V druhém gelu (s GelRed) se opět po odečtení zdálo, že se naamplifikovaly produkty až o 200 párů bazí kratší.

PCR optimalizované na pozitivních kontrolách se v dohledné době začne zkoušet na bakteriálních kmenech izolovaných z klinických materiálů, které budou identifikovány jako pozitivní na produkci karbapenemáz při použití MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

7. Závěr

Je jisté, že rezistence na karbapenemy je nepřehlédnutelným problémem, který bude v budoucnosti narůstat a komplikovat léčbu bakteriálních infekcí. V mnoha případech to pravděpodobně bude právě produkce karbapenemáz, která bude důvodem této rezistence.

Ač jsou v této práci vybrány bakteriální druhy způsobující nozokomiální infekce, tato problematika se netýká jen jich. Důraz na původce nemocničních infekcí je zde kladen proto, že právě mezi nimi se často vyskytuje jev multirezistence a při jejich léčbě se pak musí uchýlovat i k méně používaným antibiotikům, jako jsou karbapenemy.

Důvodem proč jsou karbapenemázy tak obávanou entitou je, kromě spojení s multirezistencí, neobvyklá rychlost šíření některých typů a vznik stále nových variant. Šíření genů kódujících karbapenemázy může být výsledkem horizontálního transferu těchto genů, ale také klonálním šířením. Právě molekulárně genetické přístupy detekce pak umožňují pochopit konkrétní pozadí jednotlivých případů či epidemických vzplanutí infekcí způsobených organizmy produkujícími karbapenemázy a poskytují možnost prevence dalšího šíření.

Různé druhy fenotypových testů mohou sice v mnoha případech působit jako snazší a někdy i účinnější způsob detekce rezistence na karbapenemy, neboť většinou poskytují i informaci o stupni rezistence, ale jsou to právě metody genotypové, které poskytují hlubší náhled do této problematiky. V případě rezistence způsobené produkcí karbapenemáz je žádoucí zjistit genetické pozadí jejich produkce. Molekulárně genetické přístupy nám poskytují informace nutné k prevenci dalšího šíření těchto enzymů. Jedná se o určení konkrétní varianty karbapenemázy, pozici na plazmidu či na chromozomu a zda dochází ke klonálnímu šíření nebo horizontálnímu transferu genů.

V České republice zatím není výskyt organismů produkujících karbapenemázy příliš častým jevem, ale s ohledem na množící se počet případů po celém světě je pravděpodobné, že se tato skutečnost časem změní. Včasná detekce organismů produkujících tyto enzymy zabrání zbytečnému předepisování neúčinných antibiotik a vhodnými preventivními opatřeními se může zamezit jejich šíření a šíření genů kódujících tyto enzymy.

8. Přehled užité literatury

- Abraham E. P. and Chain E. (1988) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Reviews of Infectious Diseases* 4, 677-678
- Abraham E. P. and Newton G. G. F. (1961) The Structure of cephalosporin C. *Biochemical Journal* 79, 377-393
- Acred E. P., Brown D. M., Knudsen E. T., Rolinson G. N. and Sutherland R. (1967) New semi-synthetic penicillin active against *Pseudomonas pyocyanea*. *Nature* 215, 25-30
- Afzal-Shah M. and Livermore D. M. (1998) Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41, 576-577
- Ambler R.P. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 289, 321-331
- Amudhan S. M., Sekar U., Arunagiri K. and Sekar B. (2011) OXA beta-lactamase-mediated carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Medical Microbiology* 29, 269-274
- Aoki N., Ishii Y., Tateda K., Saga T., Kimura S., Kikuchi Y., Kobayashi T., Tanabe Y., Tsukada H., Gejyo F. and Yamaguchi K. (2010) Efficacy of calcium-EDTA as an inhibitor for metallo- β -lactamase in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa pneumonia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 4582-458
- Arakawa Y., Murakami M., Suzuki K., Ito H., Wacharotayankun R., Ohsuka S., Kato N. and Ohta M. (1995) A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene *bla_{imp}*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 1612-1615
- Arakawa Y., Shibata N., Shibayama K., Kurokawa H., Yagi T., Fujiwara H. and Goto M. (2000) Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 40-43
- Bandoh K., Watanabe K., Muto Y., Tanaka Y., Kato N. and Ueno K. (1992) Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *The Journal of Antibiotics* 45, 542-547
- Barber M. (1961) Methicillin resistant *Staphylococci*. *Journal of Clinical Pathology* 14, 385-393
- Bebrone C. (2007) Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology* 74, 1686-1701
- Benner E. J., Oregon M. D., Kayser F. H. and Munich M. D. (1968) Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* 292, 741-744
- Bérézin E. B. and Towner K.J. (1996) *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews* 9, 148-165
- Betalaktamazy: www stránky Ing. Jaroslava Hrabáka, Ph.D. o β -laktamázách, dne 25. 3. 2012 <http://www.betalaktamazy.cz/mod/wiki/view.php?id=21>
- Bush K. (1989) Classification of β -Lactamases: Groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 264-270

- Bush K., Jacoby G. A. and Medeiros A. A. (1995) A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 1211-1233
- Bush K. (1998) Metallo- β -lactamases: A class apart. *Clinical Infectious Diseases* 27, 48–53
- Bush K. and Jacoby G. (1997) Nomenclature of TEM beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39, 1-3
- Bush K. and Jacoby G. A. (2010) Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 969-976
- Blanc D. S., Petignat C., Janin B., Bille J. and Francioli P. (1998) Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clinical Microbiology and Infection* 5, 242-247
- Bogaerts P., Naas T., El Garch F., Cuzon G., Deplano A., Delaire T., Huang T., Lissioir B., Nordmann P. and Glupczynski Y. (2010) GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 4872-4878
- Bradford P. A., Urban C., Mariano N., Projan S. A., Rahal J. J. and Bush K. (1997) Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 563-569
- Cao V., Lambert T., Nhu D. Q., Loan H. K., Hoang N. K., Arlet G. and Courvalin P. (2002) Distribution of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3739-3743.
- Cardoso O., Alves A. F. and Leitao R. (2008) Metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31, 375-379
- Carvalhoes C. G., Picao R. C., Nicoletti A. G., Xavier D. E. and Gales A. C. (2009) Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 249-251
- Castanheira M., Toleman M. A., Jones R. N., Schmidt F. J. and Walsh T. R. (2004) Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 4654-4661
- Cooper P. D., Rowley D. and Dawson I. M. (1949) Location of radioactive penicillin in *Staphylococcus aureus* after contact with the drug. *Nature* 164, 842-843
- Cuzon G., Naas T., Truong H., Villegas M., Wisell K. T., Carmeli Y., Gales A. C., Navon-Venezia S., Quinn J. P. and Nordmann P. (2010) Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -Lactamase *bla*_{KPC-2} gene. *Emerging Infectious Disease* 16, 1349-1356
- Das I., Lambert P., Hill D., Noy M., Bion J. and Elliott T. (2002) Carbapenem-resistant *Acinetobacter* and role of curtains in an outbreak in intensive care units. *Journal of Hospital Infection* 50, 110-114
- Davies J. (1994) Inactivation of antibiotics and dissemination of resistance genes. *Science* 264, 375-382

- Díez A. I. D., Pérez M. A. B., Marí J., Bouza E., Gómez A. A., Rodríguez P. G., Gómez M. A. M., Domingo A. O. and Rodríguez-Torres A. (2004) Susceptibility of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*A. baumannii* complex to imipenem, meropenem, sulbactam and colistin. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23, 487-493
- Ding J., Sun Q., Li K., Zheng M., Miao X., Ni W., Hong L., Yang J., Ruan Z., Zhou R., Zhou H. and He W. (2009) Retrospective analysis of nosocomial infections in the intensive care unit of a tertiary hospital in China during 2003 and 2007. *BioMed Central Infectious Diseases* 9, 1-6
- Donald H. M., Scaife W., Amyes S. G. B. and Young H. (2000) Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 196-199
- Drawz S. M. and Bonomo R. A. (2010) Three decades of β -lactamases inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 160-201
- Edwards J. R., Turner P. J., Wannop C., Withnell E. S., Grindey A. J. and Nairn K. (1989) In vitro antibacterial activity of SM-7338, a carbapenem antibiotic with stability to dehydropeptidase I. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 215-222
- Edwards J. R. and Betts M. J. (2000) Carbapenems: the pinnacle of the β -lactam antibiotics or room for improvement? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45, 1-4
- Fairbrother R. W. and Taylor G. (1961) Sodium mehticillin in routine therapy. *Lancet* 1, 473-476
- Ellington M. J., Kistler J., Livermore D. M. and Woodford N. (2007) Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamase genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 321-322
- Fleming A. (1929) On the antibacterial action of cultures of penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *The British Journal of Experimental Pathology* 10, 226-236
- Fnmotol: oficiální www stránky Fakultní nemocnice v Motole, dne 29. 3. 2012: <http://www.fnmotol.cz/o-nas/historie-a-soucasnost/>
- Gallagher J. C. and MacDougall C. (2011) Beta-lactams 37-74. *Antibiotics simplified*. 2. vydání. Jones and Bartlett Learning. Sudbury: ISBN-978-1-4496-1459-1
- Garau G., Garcia-Saez I., Mercuri C. A. P., Galleni M., Frere J. and Dideberg O. (2004) Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 2347-2349
- Garner J. S., Jarvis W. R., Emori T. G., Horan T. C. and Hughes J. M. (1988) CDC definitions for nosocomial infections. *American Journal of Infection Control* 3, 128-140
- Gaynes R. and Edwards J. R. (2005) Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. *Clinical Infectious Diseases* 41, 848-854
- Ge Y., Wikler M. A., Sahm D. F., Blosser-Middleton R. S. and Karlowsky J. A. (2004) In vitro antimicrobial activity of doripenem, a new carbapenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 1384-1396
- Geffers C. and Gastmeier P. (2010) Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany – epidemiological data from KISS. *Deutsches Ärzteblatt International* 108, 87-93

- Giske C. G., Sundsfjord A. S., Kahlmeter G., Woodford N., Nordmann P., Paterson D. L., Cantón R. and Walsh T. R. (2009) Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63, 1-4
- Giakkoupi P., Tzouveleakis L. S., Tsakris A., Loukova V., Sofianou D. and Tzelepi E. (2000) IBC-1, a novel integron-associated class A β -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 2247-2253
- Grundmann H., Livermore D. M., Giske C. G., Rossolini G. M., Campos J., Vatopoulos A., Gniadkowski M., Toth A., Pfeifer Y., Jarlier V. and Carmeli Y. (2010) Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Eurosurveillance* 15, 1-13
- Gupta N., Limbago B. M., Patel J. B. and Kallen A. J. (2011) Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention. *Clinical Infectious Diseases* 53, 60-67
- Hall B. G. and Barlow M. (2005) Revised Ambler classification of β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55, 1050-1051
- Hartman B. J. and Tomasz A. (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 158, 513-516
- Hawkey P. M. (2008) The growing burden of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62, 1-9
- Héritier C., Poirel L., Fournier P., Claverie J., Raoult D. and Nordmann P. (2005) Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 4174-4179
- Hooper D. C. (2000) Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases* 31, 24-28
- Hrabák J., Fridrichová M., Štolbová M., Bergerová T., Zemlickova H. and Urbasková P. (2009a) First identification of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Eurosurveillance* 14, přístupný online 29.3.2012 z: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19102>
- Hrabák J., Bergerová T., Žemličková H. and Urbášková P. (2009b) Detekce širokospektrých β -laktamáz (ESBL), β -laktamáz AmpC, metalo- β -laktamáz (MBL) a karbapenemáz KPC u gramnegativních tyčků. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie* 18, 100-106
- Hrabák J., Niemczyková J., Chudáčková E., Fridrichová M., Študentová V., Červená D., Urbášková P. and Žemličková H. (2011a) KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Czech patient previously hospitalized in Greece and in vivo selection of colistin resistance. *Folia Microbiologica* 10.1007/s12223-011-0057-6
- Hrabák J., Walková R., Študentová V., Chudáčková E. and Bergerová T. (2011b) Carbapenemase activity detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 3222-3227
- Hu WS, Yao SM, Fung CP et al. (2007) An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 3844–3852
- Chu Y. W., Cheung T. K. M., Ngan J. Y. W. and Kam K. M. (2005) EDTA susceptibility leading to false detection of metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem–EDTA disk method. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26, 340-341

- Imada A., Kitano K., Kintaka K., Muroi M. and Asai M. (1981) Sulfazecin and isosulfaecin, novel beta-lactam antibiotics of bacterial origin. *Nature* 289, 590-591
- Jacoby G. A. (2006) β -lactamase nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 1123–1129
- Jacoby G. A. (2009) AmpC β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 22, 161-182
- Jarvis W. A., Edwards J. R., Culver D. H., Hughes J. M., Horan T., Emori G., Banerjee S., Tolson J., Henderson T., Gaynes R. P. and Martone W. J. (1991) Nosocomial infection rates in adult and pediatric intensive care units in the United states. *The American Journal of Medicine* 91, 185-191
- Kahan F. M., Kropp H, Sundelof J. G. and Birnbaum J. (1983) J Thienamycin: development of imipenen-cilastatin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* D, 1-35
- Kappstein I., Schulgen G., Beyer U., Geiger K., Schumacher M. and Daschner F. D. (1992) Prolongation of hospital stay and extra costs due to ventilator-associated pneumonia in an intensive care unit. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 6, 504-508
- Klevens R. M., Edwards J. R., Tenover F. C., McDonald L. C., Horan T. and Gaynes R. (2006) Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clinical Infectious Diseases* 42, 389-391
- Kong K., Schneper L. and Mathee K. (2010) Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 118, 1-36
- Kuck N. A., Jacobus N. V., Petersen P. J., Weiss W. J. and Testa R. T. (1989) Comparative in vitro and in vivo activities of piperacillin combined with the β -lactamase inhibitors tazobactam, clavulanic acid, and sulbactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 1964-1969
- Kuwabara S. and Abraham E. P. (1967) Some properties of two extracellular β -lactamases from *Bacillus cereus* 569/H 103, 27c-30c
- Landman D., Bratu S., Kochar S., Panwar M., Trehan M., Doymez M. and Quale J. (2007) Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, 78-82
- Landman D., Bratu S. Kochar S., Panwar M., Trehan M., Doymaz M. and Quale J. (2009) Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology* 58, 1303-1308
- Lauretti L., Riccio M. L., Mazzariol A., Cornaglia G., Amicosante G., Fontana R. and Rossolini G. M. (1999) Cloning and characterization of *bla_{vim}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 1584-1590
- Leavitt A., Navon-Venezia S., Chmelnitsky I., Schwaber M. J. and Carmeli Y. (2007) Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 3026-3029
- Lee K., Chong Y., Shin H. B., Kim Y. A., Yong D. and Yum J. H. (2000) Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infections* 7, 88-91

- Lee S., Kim N. J., Choi S., Kim T. H., Chung J., Woo J., Ryu J. and Soo Y. (2004) Risk factors for acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: a case-control study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 224-228
- Lee K., Yum J. H., Yong D., Lee H. M., Kim H. D., Docquier J., Rossolini G. M and Chong Y. (2005) Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 4485-4491
- Li X. Z. and Nikaido H. (2004) Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 64, 159–204.
- Livermore D. M. (1992) Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36, 2046-2048
- Livermore D. M. (2002) The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2, 218-224
- Livermore D. M. and Woodford N. (2006) The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology* 14, 413-420
- Lolans K., Rice T. W., Munoz-Price S. L. and Quinn J. P. (2006) Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 2941-2945
- Maragakis L. L., Cosgrove W. E., Song X., Kim D., Rosenbaum P., Ciesla N., Srinivasan A., Carroll K. and Perl T. M. (2004) An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with pulsatile lavage wound treatment. *Journal of the American Medical Association* 292, 3006-3011
- Mataseje L. F., Bryce E., Roscoe D., Boyd D. A., Embree J., Gravel D., Katz K., Kibsey P., Kuhn M., Mounchili A., Simor A., Taylor G., Thomas E., Turgeon N. and Mulvey M. R. (2012) Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009-10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, doi: 10.1093/jac/dks046
- Mazzariol A., Bošnjak Z., Ballarini P., Budimir A., Bedenić B., Kalenić S., Cornaglia G. (2012) NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. *Emerging Infectious Diseases* 18, 532-534
- Medeiros A. A. (1997) Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases* 24, 19-45
- Minami S., Akama M., Araki H., Watanabe Y., Narita H., Iyobe S. and Mitsuhashi S. (1996) Imipenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying plasmids coding for class B β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 37, 433-444
- Miriagou V., Cornaglia G., Edelstein M., Galani I., Giske C. G., Gniadkowski M., Malamou-Lada E., Martinez-Martinez L., Navarro F., Nordmann P., Peixe L., Pournaras S., Rossolini G. M., Tsakris A., Vatopoulos A. and Cantón R. (2010) Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 112-122
- Naas T., Vandel L., Sougakoff W., Livermore D. M. and Nordmann P. (1994) Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, 1262-1270

- Naas T. and Nordmann P. (1999) OXA-type beta-lactamases. *Current Pharmaceutical Design* 5, 865-879
- Naas T., Nordmann P., Vedel G. and Poyart C. (2005) Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 4423-4424
- Naas T., Cuzon G., Villegas M., Lartigue M., Quinn J. P. and Nordmann P. (2008) Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 1257-1263
- Nemec A., Křížová L., Maixnerová M., Diancourt L., van der Reijden T. J. K., Brisse S., van den Broek P. and Dijkshoorn L. (2008) Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62, 484-489
- Nemec A., Křížová L., Maixnerová M. and Šmejcová A. (2011) Multirezistentní *Acinetobacter baumannii* nesoucí geny pro karbapenemázy NDM-1 a OXA-23 importovaný do České republiky. *Zprávy Centra Epidemiologie a Mikrobiologie* 220, 295-298
- Nikaido H. (2009) Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry* 78, 119-146
- Nordmann P., Mariotte S., Naas T., Labia R. and Nicolas M. (1993) Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 939-946
- Nordmann P., Cuzon G. and Naas T. (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infectious Diseases* 9, 228-236
- Ode T., Saito R., Kumita W., Sato K., Okugawa S., Moriya K., Koike K. and Okamura N. (2009) Analysis of plasmid-mediated multidrug resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca* isolates from clinical specimens in Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34, 347-350
- Onguru P., Erbay A., Bodur H., Baran G., Akinci E., Balaban N. and Cevik M. A. (2008) Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for nosocomial infections. *Journal of Korean Medical Science* 23, 982-987
- Pasteran F., Mendez T., Guerriero L., Rapoport M. and Corso A. (2009) Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 1631-1639
- Paton R., Miles R. S., Hood J., Amyes S. G., Miles R. S. and Amyes S. G. (1993) ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2, 81-87
- Payne D. J., Bateson J. H., Gasson B. C., Proctor D., Khushi T., Farmer T.H., Tolson D. A., Bell D., Skett P. W., Marshall A. C., Reid R., Ghosez L., Combret Y. and Marchand-Brynaert J. (1997) Inhibition of metallo-beta-lactamases by a series of mercaptoacetic acid thiol ester derivatives. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy* 41, 135-140
- Peterson D. L. and Bonomo R. A. (2005) Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews* 18, 657-686
- Pfeifer Y., Cullik A. and Witte W. (2010) Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 300, 371-379

- Pfeifer Y., Wilharm G., Zander E., Wichelhaus T. A., Gottig S., Hunfeld K., Seifert H., Witte W. and Higgins P. (2011) Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66, 1998-2001
- Philippon L. N., Naas T., Bouthors A. T., Barakett V. and Nordmann P. (1997) OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 2188-2195
- Podschun R. and Ullman U. (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 589-603
- Poirel L., Le Thomas I., Naas T., Karim A. and Nordmann P. (2000a) Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 622-632
- Poirel L., Naas T., Nicolas D., Collet L., Bellais S., Cavallo J. and Nordmann P. (2000b) Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 891-897
- Poirel L., Weldhagen G. F., Naas T., De Champs C., Dove M. G. and Nordmann P. (2001) GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 2598-2603
- Poirel L., Héritier C., Tolun V. and Nordmann P. (2004a) Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 15-22
- Poirel L., Magalhaes M., Lopes M. and Nordmann P. (2004b) Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene *bla*_{SPM-1} surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 1406-1409
- Poirel L., Rodriguez-Martinez J., Naiemi N. A.; Debets-Ossenkopp Y. J. and Nordmann P. (2010) Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 2420-2424
- Poirel L., Walsh T. R., Cuvillier V. and Nordmann P. (2011) Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 770, 119-123
- Prosperi-Meys C., Wouters J., Galleni M. and Lamotte-Brasseur J. (2001) Substrate binding and catalytic mechanism of class B β -lactamases: a molecular modelling study. *Cellular and Molecular Life Science* 58, 2136-2143
- Queenan A. M., Shang W., Schreckenberger P., Lolans K., Bush K. and Quinn J. (2006) SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 3485-3487
- Queenan A. M. and Bush K. (2007) Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 20, 440-458
- Rasmussen B. A., Bush K., Keeney D., Yang Y., Hare R., O'Gara C. and Medeiros A. A. (1996) Characterization of IMI-1 β -lactamases, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 2080-2086

- Rasmussen B. A. and Bush K. (1997) Carbapenem hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 223-232
- Reading C. and Cole M. (1977) Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 17, 615-622
- Retsema J. A., English A. R. and Girard A. E. (1980) CP-45,899 in combination with penicillin or ampicillin against penicillin-resistant *Staphylococcus*, *Haemophilus influenzae*, and *Bacteroides*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 17, 615-622
- Rhomberg P.R. and Jones R. N. (2009) Summary trends for the meropenem yearly susceptibility test information collection program: a 10-year experience in the United States (1999–2008). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 65, 414-426
- Robledo I. E., Aquino E. E., Santé M. I., Santana J. L., Otero D. M., León C. F. and Vázquez G. J. (2010) Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 1354-1357
- Sabath L. D. and Abraham E. P. (1966) Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochemical Journal* 98, 11-12
- Saino Y., Kobayashi F., Inoue M. and Mitsuhashi S. (1982) Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 22, 564-570
- Schneider I., Queenan A. M. and Bauernfeind A. (2006) Novel carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-62 from *Pandoraea pnomenusa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 1330-1335
- Sekiguchi J., Morito K., Kitao T., Watanabe N., Okazaki M., Miyoshi-Akiyama T., Kanamori M. and Kirikae T. (2008) KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 4194-4197
- Sentochnik D. E., Eliopoulos G. M., Ferraro M. J., and Moellering R. C. jr. (1989) Comparative in vitro activity of SM7338, a new carbapenem antimicrobial agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 1232-1236
- Shannon K., King A. and Phillips I. (1986) Beta-lactamases with high activity against imipenem and Sch 34343 from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 17, 45-50
- Shaw K. J., Rather P. N., Hare R. S. and Miller G. H. (1993) Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews* 57, 138–63
- Sheehan J. C. and Henery-Logan K. R. (1959) A general synthesis of the penicillins. *Journal of the American Chemical Society* 81, 5838-5839
- Solé M., Pitart C., Roca I., Fàbrega A., Salvador P., Muñoz L., Oliveira I., Gascón J., Marco F. and Vila J. (2011) First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 4402-4404
- Spratt B. G. (1977) Properties of the Penicillin-Binding Proteins of *Escherichia coli* K 12. *European Journal of Biochemistry* 72, 341-352
- Sykes R. B., Cimarusti C. M., Bonner D. P., Bush K., Floyd D. M., Georgopapadakou N. F., Koster W. H., Liu W. C., Parker W. L., Principe P. A., Rathnum M. L., Slusarchyk W. A., Trejo W. H. and Wells J. S. (1981) Monocyclic β -lactam antibiotics produced by bacteria. *Nature* 291, 489-491

- Thomson J. M. and Bonomo R. A. (2005) The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: β -lactams in peril! *Current Opinion in Microbiology* 8, 518-524
- Toleman M. A., Simm A. M., Murphy T. A., Gales A. C., Biedenbach D. J., Jones R. N. and Walsh T. R. (2002) Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50, 673-679
- Toleman M. A., Biedenbach D., Bennett D. M. C., Jones R. N. and Walsh T. R. (2005) Italian metallo- β -lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55, 61-70
- Troillet N., Carmeli Y., Venkataraman L., DeGirolamia P. and Samorea M. H. (1999) Epidemiological analysis of imipenem-resistant *Serratia marcescens* in hospitalized patients. *Journal of Hospital Infection* 42, 37-43
- Tsakris A., Petropoulou D., Pournaras S. and Sofianou D. (2009) Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 362-367
- Vahaboglu H., Ozturk R., Aygun G., Coskuncan F., Yaman A., Kaygusuz A., Leblebicioglu H., Balik I., Aydin K. and Otkun M. (1997) Widespread Detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 2265-2269
- Villegas M. V., Lolans K., Correa A., Kattan J. N., Lopez J. A. and Quinn J. P. (2007) First identification of *Pseudomonas aeruginosa* producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 1553-1555
- Wachino J. (2004) Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A β -lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 1960-1967
- Walsh T. R., Gamblin S., Emery D. C., MacGowan A. P. and Bennett P. M. (1996) Enzyme kinetics and biochemical analysis of ImiS, the metallo- β -lactamase from *Aeromonas sobria* 163a. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 37, 423-431
- Walsh T. R., Bolmstrom A., Qvarnstrom A. and Gales A. (2002) Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2755-2759
- Walsh T. R., Toleman M. A., Poirel L. and Nordmann P. (2005) Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews* 18, 306-325
- Walsh T. R. (2010) Emerging carbapenemases: a global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36S3, 8-14
- Walther-Rasmussen J. and Hoiby N. (2006) OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57, 373-383
- Walther-Rasmussen J. and Hoiby N. (2007) Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, 470-482
- Watanabe M., Iyobe S., Inoue M. and Mitsuhashi S. (1991) Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 147-151

- Wexler H. M., Molitoris D. and Finegold S. M. (2000) In vitro activities of MK-826 (L-749,345) against 363 strains of anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 2222–2224
- Woodford N., Ellington M. J., Coelho J. M., Turton J. F., Ward M. E., Brown S., Amyes S. G. B. and Livermore D. M. (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents* 27, 351–353
- Yan J., Hsueh P., Ko W., Luh K., Tsai S., Wu H. and Wu J. (2001) Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 2224–2228
- Yang Y., Wu P. and Livermore D. M. (1990) Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34, 755–758
- Yigit H., Queenan A. M., Anderson G. J., Domenech-Sanchez A., Biddle J. W., Steward C. D., Alberti S., Bush K. and Tenover F. C. (2001) Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 1151–1161
- Yong D., Toleman M. A., Giske C. G., Cho H. S., Sundman K., Lee K. and Walsh T. R. (2009) Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 5046–5054
- Yu Y., Du X., Zhou Z., Chen Y. and Li L. (2006) First isolation of *bla*_{imi-2} in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 1610–1611